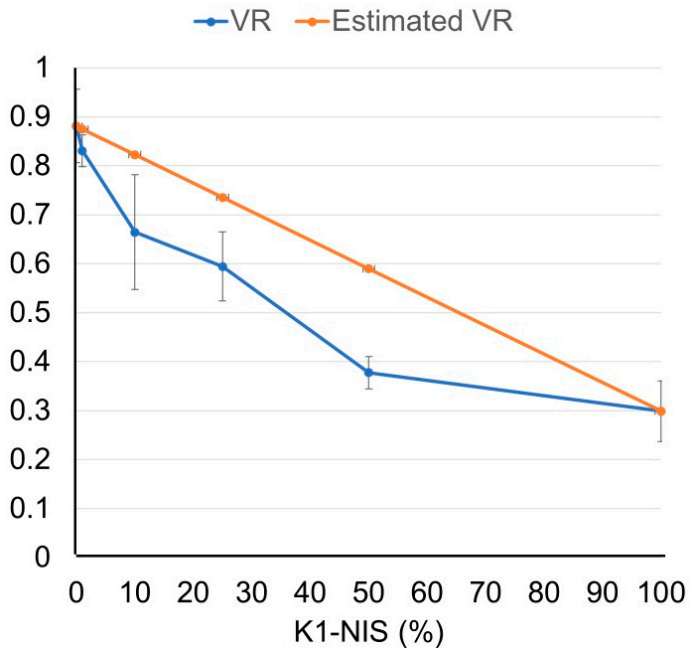
152　Radiotheranostics治療抵抗性因子の網羅的探索	子安　翔

【目的】放射性核種標識分子を用いた核医学診断・治療（radiotheranostics）抵抗性因子遺伝子の網羅的探索のための遺伝子スクリーニングの予備実験として、甲状腺乳頭癌細胞株を用いてクロスファイア効果の確認を行う。その理由は、β線によるクロスファイア効果が今回のスクリーニングの系で観測されるかどうかで、スクリーニングによって得られる遺伝子群に「I-131 の取り込み・安定化などに影響を与えるような因子」が理論上包含されるか除外されるかが予想されるからである。また、もしも培養細胞系でクロスファイア効果が見られるような実験系が確立できれば、逆にその効果が減弱するような細胞分布等が確認されればそれすなわちRadiotheranostics の治療抵抗性の原因になりうるからである。したがって、まずクロスファイア効果が培養細胞上で再現される条件はあるかを検証し、もしも検証できれば、そこからその現象が減弱するような腫瘍環境を作成できるかを検討する。

【方法】Sodium Iodide Symporter（NIS）低発現甲状腺乳頭癌細胞株の K1 から NIS 高発現株（K1-NIS）を樹立した。まず、クロスファイア効果の確認のため、これらを様々な割合（K1-NIS 細胞を 0、1、10、25、50、100%含む）で共培養し、I-131 治療時の細胞生存率（viable cell ratio : VR）を、細胞の割合と各株単独での生存率から推定される細胞生存率（Estimated VR）と比較した。次に 2 種の条件（両株が全体に均一に混在、K1-NIS は局所的に等間隔に存在）で共培養し、同様に細胞生存率を比較した。

【結果】共培養での細胞生存率は細胞の割合と各細胞単独での生存率から推定される値より低く、クロスファイア効果が確認できた。NIS 高発現細胞の不均一な分布により I-131 治療効果の低下を確認した。

クロスファイア効果の確認



152. Radiotheranostics 治療抵抗性因子の網羅的探索

子安　翔

京都大学 医学部附属病院 放射線部

Key words：radiotheranostics，治療抵抗性，甲状腺癌，クロスファイア効果

緒　言

放射性核種標識分子を用いた核医学診断・治療（radiotheranostics）は、特定の分子を標的としたイメージングの腫瘍特異性を利用し、治療用のβ線もしくはα線放出核種を腫瘍細胞選択的に届けることによって、健康な細胞への影響を最小限に抑えながら高い選択性でがん細胞に放射線を照射する極めて合理的な治療法である。これまでβ線核種である I-131 NaI 治療が分化型甲状腺癌の標準治療として行われているが、15～40%程度の患者で治療薬である I-131 集積は認めるにもかかわらず病変への治療効果が得られない事例が存在している（自施設データおよび甲状腺腫瘍診療ガイドライン 2018）。

甲状腺癌の I-131 NaI 治療抵抗性の原因に関する研究はヨウ化ナトリウムを取り込む Sodium Iodide Symporter（NIS）の発現低下に関するものがこれまでの報告のほぼすべてである［1］が、実際に臨床で経験し、かつ問題になる「I-131 が集積するにもかかわらず治療抵抗性を生ずる原因」は説明できない。また、β線はその飛程がα線と比較して長いため、いわゆるクロスファイア効果［2］があるものと考えられる。すなわち腫瘍内部に microscopic に NIS 低発現細胞が存在していたとしても I-131 が集積している病変であれば隣接する NIS 陽性細胞が取り込んだ I-131 により同様に治療できると考えられ、実は本当の意味でのβ線治療抵抗性に焦点を当てた研究とはならない。

我々は、NIS 低発現のヒト甲状腺乳頭癌細胞株である K1 にレンチウイルスを用いて NIS 発現を導入し、全遺伝子を対象とした機能欠失を利用する順遺伝学的手法で網羅的に未知の因子をスクリーニングする研究を計画した。約 50,000 種類のガイド RNA（gRNA）ライブラリーを 1 細胞あたり平均 gRNA 1 種類になるように導入した KO 細胞ライブラリーを作製し、I-131 NaI 治療後に次世代シークエンサー解析により生存細胞中の gRNA を検出するものである。その前提となる実験として、甲状腺乳頭癌細胞株を用いてクロスファイア効果の確認を行う。その理由は、β線によるクロスファイア効果が今回のスクリーニングの系で観測されるかどうかで、スクリーニングによって得られる遺伝子群に「I-131 の取り込み・安定化などに影響を与えるような因子」が理論上包含されるか除外されるかが予想されるからである。

本報告では、遺伝子スクリーニングの予備実験として行ったクロスファイア効果の確認について述べる。クロスファイア効果は古典的な事実と考えられているが、甲状腺癌の I-131 NaI 治療において培養細胞系でクロスファイア効果を示した研究はこれまでにない。また、クロスファイア効果が今回の系で確認されるかどうかにより遺伝子スクリーニングにより検出できる gRNA が異なると予想できる。すなわち、ノックアウトした際に I-131 の取り込みや安定化の低下を来たす遺伝子について、もし培養細胞系でクロスファイア効果による治療効果が生じるのであれば、そういった遺伝子はスクリーニングによって偽陰性になると予想され、逆により純粋にβ線治療抵抗性を獲得する遺伝子群をターゲットとした gRNA を獲得しやすくなると想定される。

一方、β線を用いた radiotheranostics において集積の不均一性による治療効果の低下が示唆されている［3, 4］が、甲状腺癌の I-131 NaI 治療抵抗性の原因として集積の不均一性がどの程度寄与するかを示した研究はこれまでにない。我々は、NIS 高発現細胞の不均一な分布、すなわち I-131 集積の不均一性が「I-131 が集積するにもかかわらず治療抵抗性を生ずる原因」の一つではないかと考え、*in vitro* での再現を試みた。

なお、本研究内容で、The 16th Asia and Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology(AOCNMB)2024 で開催された AOSNM 主催の Rising Nuclear Medicine Professional Challenge で、当研究室の田中寛彬大学院生が Bronz prize を受賞した。

方　法

1. NIS 高発現甲状腺癌細胞株の樹立、細胞培養

K1 細胞は株式会社ケー・エー・シーから購入した。NIS 発現は、K1 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、レンチウイルスベクターpLV[Exp]-EGFP/Neo-CMV>hSLC5A5[NM_000453.3]（VectorBuilder）を用いて導入した。目的遺伝子の導入を確認した後、G418（富士フイルム和光純薬株式会社）を用いて薬剤選択を行い、セルソーターで GFP 高発現する細胞（K1-NIS）を得た。

K1 細胞および K1-NIS 細胞は、10% fetal bovine serum・1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加した D-MEM（ナカライテスク株式会社）・Ham's F12（ナカライテスク株式会社）・MCDB 105（Cell Applications）の混合培地（2：1：1）で培養した。

2. Cell surviving assay

ヨウ化ナトリウム溶液は PDR ファーマ株式会社から購入した。細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1×10^5 個播種した。24 時間の培養後、培地を 0.8 MBq/ml の I-131 を含む培地または放射性ヨウ素を含まない新鮮な培地に交換し、さらに 48 時間培養した。トリプシン処理後、生存細胞数をカウントし、I-131 含有培地中の生存細胞数と I-131 非含有培地中の生存細胞数の比をとることで細胞生存率（viable cell ratio：VR）を算出した。

3. Uptake assay

細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1×10^5個播種した。24 時間の培養後、培地を約 3 kBq/ml の I-131 を含む培地に交換し、さらに 48 時間培養した。細胞を 1 M NaOH で溶解し、ガンマカウンターを用いた放射線測定と BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いたタンパク質定量を行い、投与した放射能量における細胞 1 mg に取り込まれた放射能量の割合（%dose/mg protein）を算出した。

4. クロスファイア効果の確認

K1 および K1-NIS 細胞を様々な割合（K1-NIS 細胞を 0、1、10、25、50、100%含む）で培地に懸濁し、6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1×10^5個播種し Cell surviving assay により VR を算出した。K1 細胞のみ（すなわち K1-NIS 0%）の VR（VR_K1）、K1-NIS 細胞のみ（すなわち K1-NIS 100%）の VR（VR_K1-NIS）と各細胞の割合から、Cross-fire 効果が無いと仮定した場合に推定される共培養時の VR を算出し（Estimated VR）、実際の VR と比較した。

$$\text{Estimated VR} = \{\text{VR_K1} \times \text{K1 細胞の割合（\%）} + \text{VR_K1-NIS} \times \text{K1-NIS 細胞の割合（\%）}\} / 100$$

5. 均一・不均一な条件での比較

K1 細胞と K1-NIS 細胞を、K1-NIS 細胞が均一に分布する条件（Condition A）と不均一に分布する条件（Condition B）で、6 ウェルプレートで共培養した。Condition A では、K1 細胞と 1/9 の K1-NIS 細胞を培養液に懸濁し播種した。Condition B では、K1-NIS 細胞をウェル内の 37 カ所に等間隔に播種し、1 時間後に 9 倍の K1 細胞を含む懸濁液を静かに添加した。いずれの条件においても 1 ウェル当たり 1×10^5個となるよう調節した。Cell surviving assay によりそれぞれの条件における VR（VR_A、VR_B）を算出した。

6. 統計

データは各条件につき 3 ウェルから得られた測定値の平均値±標準偏差で示した。VR（平均値）と Estimated VR（固定値）は対応のある t 検定、2 群間の平均値は対応のない t 検定を用いて比較した。$P<0.05$ を統計的に有意とみなした。

結　果

1. クロスファイア効果の確認

VR_K1＝0.88±0.08、VR_K1-NIS＝0.30±0.06 であり、K1-NIS 細胞は K1 細胞と比較して、I-131 含有培地で培養した際の細胞生存率が有意に小さく（$P<0.01$）、K1-NIS において I-131 の治療効果が高いことを確認できた。共培養時の VR は、VR_K1、VR_K1-NIS および各細胞の割合から推定される Estimated VR と比較して有意に小さかった（表 1、図 1）。

表 1. クロスファイア効果の確認

K1（%）	K1-NIS（%）	VR（平均値±標準偏差）	Estimated VR	*P*
100	**0**	0.88±0.08	−	−
99	**1**	0.83±0.03	0.88	0.03
90	**10**	0.66±0.12	0.82	0.03
75	**25**	0.59±0.07	0.74	＜0.01
50	**50**	0.38±0.03	0.59	＜0.01
0	**100**	0.30±0.06	−	−

共培養時の VR は、VR_K1、VR_K1-NIS と各細胞の割合から推定される Estimated VR と比較して有意に小さかった。

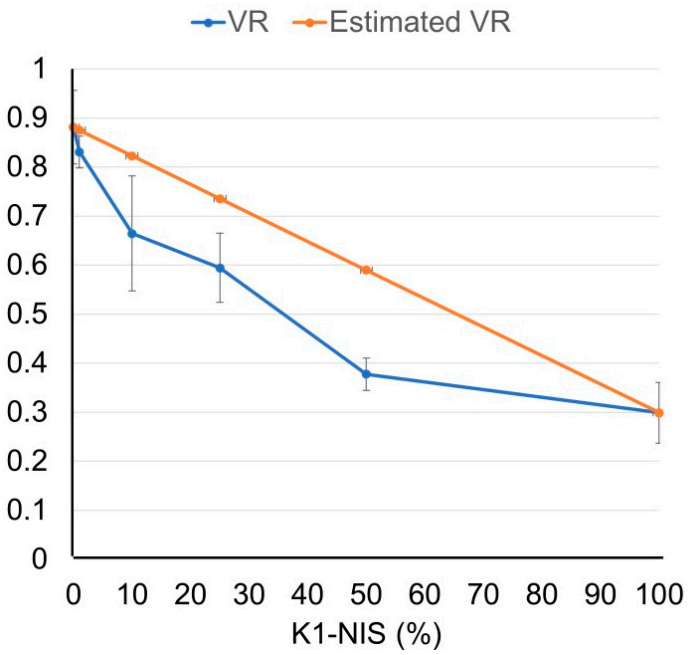


図 1. クロスファイア効果の確認
共培養時の VR は、VR_K1、VR_K1-NIS と各細胞の割合から推定される Estimated VR と比較して有意に小さかった。

2. 均一・不均一な条件での比較

VR_A は VR_B と比較して有意に小さかった（VR_A＝0.58±0.04、VR_B＝0.76±0.13；*P*＝0.02）。細胞に取り込まれた放射能については、Condition A、B の間に有意差を確認できなかった（図 2、表 2）。

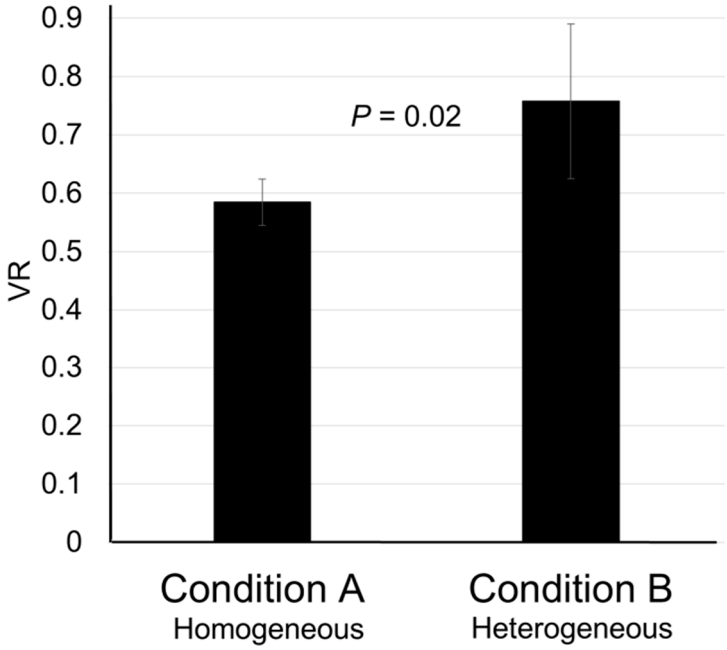


図 2. 均一・不均一な条件での比較
VR_A は VR_B と比較して有意に小さかった。

表 2. 均一・不均一な条件での比較

	%dose/mg protein （平均値±標準偏差）	CPM （平均値±標準偏差）
Condition A	11.81±1.25	4527±315
Condition B	11.92±0.35	4494±38

Condition A、B の間で、細胞に取り込まれた放射能に有意差を確認できなかった。

考　察

本研究では、まず K1 細胞と K1-NIS 細胞を共培養することで、細胞生存率の減少すなわち I-131 治療効果の向上を確認することができた。これはクロスファイア効果の影響が考えられ、遺伝子スクリーニングにおいて I-131 の取り込みや安定化に関与する遺伝子群は理論上得られにくくなり、逆に純粋にβ線治療抵抗性を獲得した細胞が得られやすくなると想定することができた。

また、NIS 高発現細胞の不均一な分布により I-131 治療効果の低下を確認した。この結果は（モデルとしたのは大腸癌細胞であるが）I-131 を含む radiotheranostics の治療効果のシミュレーション結果［3］と合致しており、不均一な分布によるクロスファイア効果の変動に伴った「I-131 が集積するにもかかわらず治療抵抗性を生ずる原因」の一つと考えられる。

しかしながら、以上の結果は I-131 治療効果を細胞生存率のみでしか確認できておらず、今後遺伝子スクリーニングとともに、蛍光顕微鏡を用いて DNA 損傷が引き起こされた細胞の分布の確認を行う。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学医生物学研究所生命システム研究部門の青木一成助教、大阪大学大学院医学系研究科放射線医学講座の渡部直史講師、同大学院理学研究科の兼田加珠子教授である。

文　献

1) Oh JM, Ahn BC. Molecular mechanisms of radioactive iodine refractoriness in differentiated thyroid cancer: Impaired sodium iodide symporter (NIS) expression owing to altered signaling pathway activity and intracellular localization of NIS. Theranostics. 2021 Apr 15;11(13):6251-6277. doi: 10.7150/thno.57689. PMID: 33995657; PMCID: PMC8120202.

2) Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, Mier W, Apostolidis C, Boll R, Murphy K, Haberkorn U, Morgenstern A. ^{213}Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2014 Nov;41(11):2106-19. doi: 10.1007/s00259-014-2857-9. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25070685; PMCID: PMC4525192.

3) Kalogianni E, Flux GD, Malaroda A. The use of BED and EUD concepts in heterogeneous radioactivity distributions on a multicellular scale for targeted radionuclide therapy. Cancer Biother Radiopharm. 2007 Feb;22(1):143-50. doi: 10.1089/cbr.2007.308. PMID: 17627423.

4) Hanaoka K, Hosono M, Tatsumi Y, Ishii K, Im SW, Tsuchiya N, Sakaguchi K, Matsumura I. Heterogeneity of intratumoral (111)In-ibritumomab tiuxetan and (18)F-FDG distribution in association with therapeutic response in radioimmunotherapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. EJNMMI Res. 2015 Mar 14;5:10. doi: 10.1186/s13550-015-0093-3. PMID: 25853016; PMCID: PMC4385239.